



БиоМастер Хай-Фай ПЦР (2×)

Кат. номер МН041-100, МН041-400

Описание

Набор БиоМастер **Хай-Фай ПЦР (2×)** содержит 2× реакционную смесь БиоМастер **Хай-Фай ПЦР**, стерильную воду и 6× буфер для нанесения на гель. Реакционная смесь БиоМастер **Хай-Фай ПЦР (2×)** предназначена для амплификации фрагментов ДНК от 0,1 до 15 т.п.о. с высокой точностью, повышенными специфичностью и продуктивностью. В состав реакционной смеси БиоМастер **Хай-Фай ПЦР (2×)** входят все необходимые компоненты для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры):

- Высокоточная полимераза (Фьюжн 2.0);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} .

Смесь БиоМастер **Хай-Фай ПЦР (2×)** содержит модифицированный вариант Фьюжн ДНК-полимеразы, полученной путем слияния термостабильной ДНК-полимеразы *Pyrococcus furiosus* (Pfu) и ДНК-связывающего белка термофильных архей вида *Saccharolobus solfataricus* (Sso7d). В ген полимеразы Фьюжн 2.0 был добавлен ряд мутаций, повышающих точность фермента, а слияние полимеразы с Sso7d обеспечивает увеличение скорости наработки продукта. Благодаря этому полимераза Фьюжн 2.0, обладает повышенной точностью относительно своего первоначального варианта Фьюжн ДНК-полимеразы (продукт № E-11001) примерно в 3 раза и в ~15 раз относительно «нативной» Taq ДНК-полимеразы (продукт E-3001)*. Фьюжн 2.0 полимераза обладает 5'→3' полимеразной активностью, 3'→5' экзонуклеазной активностью и синтезирует продукты с тупыми концами. Фермент не проявляет 5'→3' экзонуклеазной активности.

* данные получены путем амплификации фрагментов ДНК различными полимеразами, клонирования ампликонов в вектор, трансформации клеток, и секвенирования фрагментов из нескольких произвольных клонов, содержащих вектор со встроенными фрагментами ДНК.

Область применения:

1. Фьюжн 2.0 полимераза подходит для высокоточной амплификации фрагментов ДНК размером до 15 т.п.н. и их последующего клонирования.
2. Фьюжн 2.0 полимераза в составе БиоМастер **Хай-Фай ПЦР (2×)** подходит для амплификации фрагментов ДНК методом ПЦР из различных образцов

с высоким содержанием ингибирующих веществ различной природы (гепарин, кровь, почвенный экстракт, ЭДТА, СДС и прочие).

Буфер, оптимизированный для эффективной работы полимеразы, обеспечивает высокий выход продукта. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

Каталожный номер	БиоМастер Хай-Фай ПЦР (2х)	Вода	Буфер для нанесения (6х)	Кол-во реакций по 50 мкл
МН041-100	2 × 1,25 мл	2 × 1,25 мл	1 × 0,5 мл	100
МН041-400	6 × 1,67 мл	2 × 1,8 мл	1 × 1 мл	400

Состав БиоМастер Хай-Фай ПЦР (2х)

20 мМ Трицин, рН 8,9 (при 25 °С), 100 мМ КСl, 0,8 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 6 мМ MgSO₄, 0,08 ед. акт./мкл Фьюжн 2.0 полимеразы, стабилизаторы ДНК-полимераз.

Область применения

- Высокоточная ПЦР;
- Получение продуктов для клонирования;
- Амплификация образцов для секвенирования.

Свойства реакционной смеси

- Смесь оптимизирована для специфичной работы Фьюжн 2.0 полимеразы;
- Состав смеси обеспечивает возможность длительного хранения (хранение БиоМастер Хай-Фай ПЦР (2х) в течение 7 дней при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР) и многократного замораживания-размораживания (более 50 раз).

Преимущества использования

- Амплификация длинных фрагментов;
- Точность полимеразы в ~15 раз выше «нативной» Taq ДНК-полимеразы;
- Высокая скорость наработки фрагментов ДНК (1 kb/15 сек);
- Сокращение времени на подготовку реакции;
- Амплификация широкого спектра ДНК-матриц;
- Снижение вероятности контаминации при смешивании компонентов ПЦР.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозить реакционную смесь и тщательно перемешать.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер Хай-Фай ПЦР (2x)	25	1x
Прямой праймер	переменный	0,1-800 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1-800 нМ
ДНК-матрица	переменный	1-500 нг
Стерильная вода	до 50 мкл	

Примечание: добавление матрицы необходимо осуществлять на льду!

3. Осторожно перемешать и сбросить капли со стенок пробирки, используя центрифугу.

Примечание: в случае использования амплификатора без греющейся крышки, добавить в каждую пробирку каплю (25 – 35 мкл) минерального масла.

4. Провести ПЦР, используя рекомендованный режим:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	
Отжиг	50-68 (Tm-5)	5-15 сек	30-35
Элонгация	72	X сек	
Финальная элонгация	72	5-15 мин	1

Tm – температура плавления дуплекса матрица/праймер определяется структурой праймеров. Для приблизительного расчета Tm можно воспользоваться формулой: $Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$.

X – время элонгации зависит от длины амплифицируемой последовательности, на амплификацию одной тысячи пар нуклеотидов требуется 20 секунд.

5. После проведения ПЦР анализ продуктов амплификации проводится разделением методом гель-электрофореза с последующим окрашиванием.

Примечание: Подвижность красителей в 0,5–1,5% агарозном геле

Ксилен цианол	Бромфеноловый синий	Orange G	Тартразин
10000 – 4000 п.о.	500-400 п.о.	<100 п.о	<20 п.о.

Условия хранения

Хранить в месте, защищенном от попадания света:
при +25 °С – 7дней; при +4 °С – 4 месяца; при -20 °С – 18 месяцев;
не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Условия транспортировки

Транспортируется в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, допускается повышение температуры до температуры окружающей среды при транспортировке до 10 дней.